農桿菌媒介接種番茄黃化捲葉泰國病毒及其應用

農試所植病組 鄭櫻慧 蔡筱婷　農試所應動組 林鳳琪
農試所作物組 康樂　屏東科技大學 江主惠

一、前言

根據108年農業統計年報資料，加工及食用番茄 (tomato, *Solanum lycopersicum* Mill.)在國內的栽培面積約4,325公頃，產量達104,793公噸，產值3,887,847千元，是我國重要的蔬果。番茄病害種類繁多，嚴重發生時影響產量及農民收益，重要病害包括萎凋病 (*Fusarium oxysporum Schltdl*. f. sp. *lycopersici*)、 晚疫病 (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary)、疫病 (*Phytophthora capsici* Leon.)、青枯病 (*Ralstonia solanacearum*)、細菌性斑點病 (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. perforans* & *X. vesicatoria*) 和病毒病等。病毒病以粉蝨傳播的豆類黃金嵌紋屬 (*Begomovirus*) 病毒引起的捲葉病最為嚴重，若粉蝨密度控制稍有不慎，常造成全園全面發生，嚴重時導致全軍覆沒而全無收成。台灣有紀錄引起番茄捲葉病的begomoviruses有藿香薊葉脈黃化病毒 (ageratum yellow vein virus, AYVV)、霍香薊葉脈黃化花蓮病毒 (ageratum yellow vein Hualien virus, AYVHuV)、番茄捲葉新竹病毒 (tomato leaf curl Hsinchu virus, ToLCHsV)、番茄捲葉台灣病毒 (tomato leaf curl Taiwan virus, ToLCTWV)及番茄黃化捲葉泰國病毒 (tomato yellow leaf curl Thailand virus, TYLCTHV)等。2005年以前以ToLCTWV為引起捲葉病的主要病毒，之後逐漸由TYLCTHV取代成為主要病毒，大部分的捲葉病為複合感染。病毒病害無法使用農藥直接防治，防治媒介昆蟲能夠有效降低病毒傳播速度。台灣初秋至春末常遇到乾旱少雨的氣候，粉蝨大量發生，此時高海拔地區與平地番茄栽培時期重疊，常使番茄捲葉病大量發生。培育抗病品種是防治病毒病害最經濟有效的方法，目前抗捲葉病是番茄選育很重要的育種目標。番茄主要抗病基因存在於野生種，已知抗性基因有*Ty-1* (來自智利番茄 (*Solanum chilense*))、*Ty-2* (來自野生番茄 (*S.*

作　　者：鄭櫻慧副研究員
連絡電話：04-23317517

habrochaites))、*Ty-3* (來自智利番茄)、*Ty-4* (來自智利番茄) 及 *Ty-5* (來自秘魯番茄 (*S. peruvianum*))、*Ty-6* (來自智利番茄)。目前已知病毒的C2基因與*Ty-2* 抗病基因作用，病毒若有beta衛星核酸則可以克服*Ty-1*抗病基因。亞蔬－世界蔬菜中心的研究顯示，單一抗病基因對於TYLCTHV或複合感染無法有效抵抗，組合兩個以上抗病基因能得到較明顯的防治效果。

二、農桿菌媒介接種番茄黃化捲葉泰國病毒

番茄捲葉病相關病毒的傳播特性:豆類黃金嵌紋病毒屬病毒經由粉蝨傳播，除了豆類黃金嵌紋病毒 (bean golden mosaic virus, BGMV)、番茄捲葉新德里病毒(tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV)可機械傳播之外，大部分的病毒無法機械接種。學者以能機械接種傳播與不能機械接種傳播的ToLCNDV研究，發現移動蛋白(movement protein, MP)的第19個胺基酸決定ToLCNDV能否被機械接種。番茄黃化捲葉泰國病毒雖有機械接種報告，但僅限於特定品種，病毒在田間主要以粉蝨進行傳播。

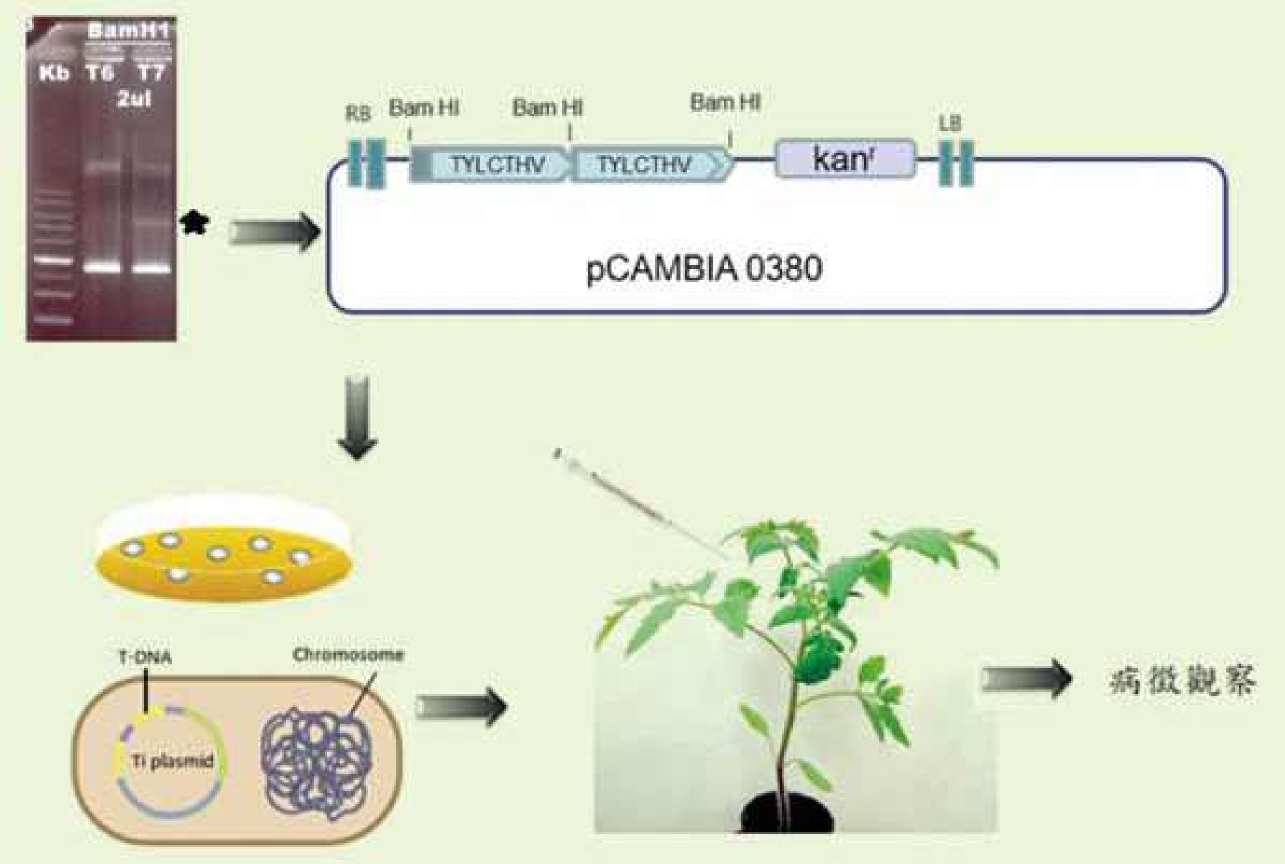
農桿菌媒介感染原理：自然界的農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)為一種造成植物冠纓病的病原細菌，此細菌能把致腫瘤質體(Ti-plasmid)的T-DNA從細菌轉移到植物細胞並嵌入植物染色體，迫使植物細胞不斷增生並生產特殊胺基酸衍生物，作為農桿菌的碳素源及氮素源。科學家改造Ti-plasmid，去除致腫瘤基因，留下轉移特性相關基因，構築基因轉殖載體。Ti轉殖載體除了應用於轉殖外源基因培育基因轉殖作物之外，也常用於媒介難以接種或無法接種的病毒感染寄主植物。以番茄黃化捲葉病毒為例，將病毒全基因體置於T-DNA之內，利用農桿菌感染將病毒導入植物細胞，之後病毒即可進行複製達到感染植物的效果。溫度超過30℃會導致Ti質體不穩定而自農桿菌消失，失去基因轉移的能力，因此培養具有基因轉移能力的農桿菌、利用農桿菌進行轉殖或媒介病毒感染都需要在低於30℃的環境進行。

農桿菌媒介豆類黃金嵌紋屬病毒接種流程:農桿菌媒介豆類黃金嵌紋屬病毒接種流程如圖一：(1)首先抽取罹病植物的總量DNA，進行滾環式擴增法(rolling cycle amplification, RCA)，RCA產物以限制酶進行部分剪切，得到2倍基因體的串聯重複(tandem repeats)；(2)串聯重複置入Ti質體的T-DNA，此Ti質體轉殖至農桿菌；(3)在植物製造傷口協助農桿菌感染，使T-DNA轉移至傷口附近之植物細胞，即完成接種過程；(4)接種植株置於溫室中觀察病徵發展(圖二)，用PCR檢測感染與否(圖三)。接種使用之器具、保濕棉花及試驗後植株以高溫高壓滅菌銷毀。步驟(1)中所示為只有DNA-A的單基因體病毒的流程，如AYVV。TYLCTHV等有DNA-A及DNA-B的雙基因體病毒，RCA產物須以不同限制酶部分剪切處理，分別得到DNA-A及B的串聯重複，2

串聯重複可置入同一Ti質體或置入不同Ti質體及農桿菌，再以混合菌液進行接種。

三、農桿菌媒介接種篩選番茄抗病性的優缺點

優點：(1)接種原確定：以攜帶病毒的農桿菌作為接種原，農桿菌可以用細菌的操作方法長期保存、單一菌落分離保持純度及培養接種菌原都有既有條件執行，保持接種原確定。(2)可調式複合接種：可以依照育種導入的抗病基因，選擇適合的接種病毒菌株或數種病毒株複合接種，接種病毒確定無誤，增加接種試驗準確度。以粉蝨進行傳毒需要持續準備不同感染原植株，分別飼育粉蝨使其帶不同病毒，準備工程相對浩大且不易進行，且必須完全隔絕粉蝨才能避免交互汙染。(3)發病時間一致：農桿菌媒介接種到植株發病時間會因為氣溫等環境條件或植物抗性而有數天的差異，但接種後測試植物受到的接種病毒壓力一致，發病的時間一致，較粉蝨傳毒需要的觀察時間短，節省試驗時間。(4)優化試驗環境：以粉蝨傳毒進行不同條件接種病毒時需要在昆蟲飼養籠內進行，

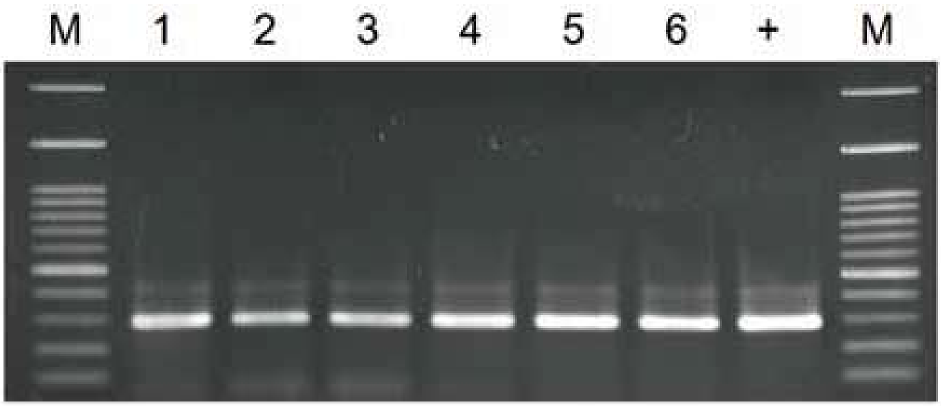


圖一、農桿菌媒介番茄黃化捲葉病毒的試驗流程。以罹病植物的總量DNA進行滾環式擴增再以限制酶進行部分剪切，得到2倍基因體的串聯重複(星號標示)，串聯重複置入Ti質體的T-DNA，此Ti質體轉殖至農桿菌，在植物製造傷口協助農桿菌感染，使T-DNA轉移至傷口附近之植物細胞完成接種過程，接種植株至於溫室中觀察病徵發展。圖中農桿菌示意圖摘自網頁 (http://2010.igem.org/Team:Nevada/Agrobacterium_Transformations)。

飼養籠光照不足，不如農桿菌媒介接種可以直接放置於溫網室，番茄生長條件與一般栽培環境類似，可以準確觀察病毒對測試品種的影響。(5)無需飼育粉蝨：粉蝨飼養需要較長時間，也容易受到氣候影響，農桿菌媒介接種的接種原只需在定溫生長箱培養2天，操作上容易很多。(6)節省試驗空間：測試植株接種後可以置於一般溫網室觀察，不需要特別隔離，大幅節省試驗需要的空間。以測試品種的葉片圓盤接種病毒，進行篩選可抑制病毒複製的品種，一個培養皿就能篩選數個測試品種，更是大幅節省試驗空間與管理人力。

缺點：(1)漏失抗粉蝨的種原材料：抗粉蝨的種原材料不但能降低粉蝨族群，也能達到防治病害的效果，不經由粉蝨傳毒，而以農桿菌接種時會因為植株表現病徵誤判而漏失這些測試抗粉蝨的種原材料。(2)接種強度固定：農桿菌媒介接種後病毒基因插入穿刺傷口附近細胞，原理上可以持續轉錄產生病毒，類似帶毒粉蝨不斷傳入病毒，接種壓力較強。以粉蝨傳毒則可以利用控制帶毒粉蝨數量，測試不同的接種強度。

圖二、番茄捲葉病田間病徵(圖左)，農桿菌媒介接種4週後，農友301番茄植株觀察到的新葉捲曲病徵。



圖三、農桿菌媒介接種番茄3週之後，抽取植株上位葉的總量核酸，以TYLCTHV的專一性引子對(TYup: ^{2454} CTGCAGATTCTGATGAATAA^{2475}/ TYdw: ^{2725}AATATTA(A/T)(A/T/C/G)CGGATGGCCGC^{2744})進行PCR檢測，6棵接種植株均檢出媒介接種的TYLCTHV。

四、結語

根據台灣植物病害名彙記載，農桿菌感染紫花宿苑、蕃菜、桉樹、榕樹、蘋果及薔薇等植物引起癌腫病，為台灣常見病原細菌。媒介接種使用的農桿菌已去除造成癌腫基因，不會造成植物病害，類似土壤中的腐生細菌。T-DNA導入的轉型細胞僅限於接種部位，不會增殖，能夠造成病毒接種的效果是因為T-DNA導入植物細胞之後，以病毒本身基因進行複製，而造成植物感染。因為具有接種病毒的確定，可以依導入基因篩選病毒組合等優點，農桿菌媒介接種番茄黃化捲葉泰國病毒很適合配合分子育種，進行確認選育品種的抗病性，以農桿菌媒介還可以節省植物栽培空間與發病觀察時間，大幅提升抗病篩選的效率。以實驗室建立的番茄黃化捲葉泰國病毒農桿菌媒介接種系統接種番茄農友301品種，在2周內觀察到80-90%的植株出現明顯的新葉捲曲的典型病徵。應用此技術參與「提升輔助產業升級之耐逆境蔬菜選育技術」研究計畫，評估國內各改良場所培育之潛力番茄品種進行抗病特性評估。如果用農桿菌媒介接種進行種原篩選，則需要注意是否具有抗粉蝨的特性，避免漏失珍貴種原。農桿菌媒介接種番茄捲葉病毒等無法機械接種的雙生病毒，有機械接種的快速準確與便利，省去以粉蝨等媒介昆蟲傳播感染的麻煩，協助分子育種確認抗病基因效果，實為抗病育種的利器。

五、參考文獻

Czosnek H., Kheyr-Pour A., Gronenborn B., Remetz E., Zeidan M., Altman A., Rabinowitch H.D., Vidavsky S., Kedar N., Gafni Y., Zamir D., 1993. Replication of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf discs from selected tomato genotypes. Plant Molecular Biology 22: 995-1005.

Kheyr-Pour A., Gronenborn B., Czosneck S., 1994. Agroinoculation of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) overcomes the virus resistance of wild Lycopersicon species. Plant Breeding 112: 228-233.

Lee B. C., Ueda S., Yoon Y.-N., Shin D. B., and Kang H.-W. 2014. Molecular characterization of Tomato yellow leaf curl virus in Korea and the construction of an infectious clone. Res. Plant Dis. 20: 219-222.

Tsai, W. S., S. L. Shih, L. Kenyon, S. K. Green, and F. J. Jan. 2011.Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan. Plant Pathology 60:787-799.

Yan, Z., P. Ana, D. Maria, H. Samuel, V. Richard, W. Anne-Marie, Y. Bai, and J. Li. 2018. Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Tomato Germplasm. Frontiers in Plant Science, 9.